

## MONO CONFIRM TEST

Per l'identificazione di *Listeria* spp. e la conferma di *Listeria monocytogenes*

### DESCRIZIONE

Mono Confirm Test è un micrometodo basato su 4 reazioni biochimiche, per l'identificazione delle colonie di *Listeria* spp. isolate da campioni alimentari, ambientali e la differenziazione di *Listeria monocytogenes* dalle altre specie del genere *Listeria*. I substrati specifici sono essiccati in micropozzetti di plastica; il kit fornisce 12 strisce, ciascuna con otto pozzetti: con una striscia è possibile esaminare 2 ceppi coltivati su terreni selettivi per *Listeria* o su terreni al sangue d'uso generale. Il genere *Listeria* è differenziato dagli altri batteri Gram positivi o Gram negativi per mezzo dei seguenti test:  $\beta$ -glucosidasi, produzione di acidi dall'arabitol e dall' $\alpha$ -metil-D-glucoside; *L.monocytogenes* è identificata attraverso la determinazione di uno specifico enzima, una aminopeptidasi comune a tutte le specie non patogene di *Listeria* ed assente in *L. monocytogenes*.

### CONTENUTO DEL KIT

- 12 strisce da 8 pozzetti, per eseguire 24 identificazioni; con i substrati essiccati nei pozzetti è possibile eseguire i seguenti test:

POZZETTO	TEST	SUBSTRATO CONTENUTO NEL POZZETTO
A o E	produzione di acidi dall'arabitol (ARA)	D – arabitol
B o F	produzione di acidi dall' $\alpha$ - metil D-glucoside (MEGLU)	$\alpha$ - metil - D – glucoside
C o G	$\beta$ - glucosidasi (X-GLUPY)	5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -D-glucopiranoside
D o H	aminopeptidasi (AMP)	aminoacil - $\beta$ - naftilamide

- o Supporto per strip, munito di coperchio
- o Dimetilaminobenzaldeide, soluzione al 5% in acido cloridrico 10%, 4 ml
- o 24 pipette con bulbo
- o Standard Mc Farland n° 2
- o Istruzioni per l'uso
- o Foglio per trascrivere i risultati

### MATERIALE NECESSARIO MA NON FORNITO NEL KIT

- o Inoculation Fluid (24 provettine -codice 524510)
- o Provette da 2-3 ml
- o Tampone di fibra sintetica o di cotone sterili
- o Soluzione fisiologica sterile
- o Incubatore

### CAMPIONE

Il campione per l'esecuzione del test è costituito da colonie isolate su terreno di coltura.

### IMPIEGO

1. Prelevare colonie pure dal terreno selettivo per *Listeria* (escluso Mac Bride Agar) o da subcoltura in terreno al sangue d'uso generale (Tryptic Soy Blood Agar, Columbia Blood Agar, ecc.). Eseguire una colorazione Gram, i test della catalasi e dell'ossidasi, la mobilità. I ceppi di *Listeria* spp. appaiono come corti bastoncini Gram positivi, mobili a 25°C ed immobili a 37°C, catalasi positivi ed ossidasi negativi. In accordo alle raccomandazioni ufficiali, è opportuno identificare separatamente 4-6 colonie per piastra, poichè specie differenti di *Listeria* possono coltivare insieme, da uno stesso campione.
2. Preparare una sospensione batterica con le colonie coltivate su terreno selettivo o su agar sangue e tipizzate come descritto al punto precedente, in 1ml di soluzione fisiologica sterile o in una provetta di Inoculation Fluid (cat. n. 524510) con torbidità pari a quella dello standard Mc Farland 2 fornito nel kit, utilizzando da 6 a 8 colonie.
3. Trasferire le strisce necessarie al lavoro d'identificazione sull'apposito supporto.
4. Distribuire 3 gocce di sospensione batterica nei pozzetti delle file A-B-C-D oppure delle file E-F-G-H utilizzando le pipette a bulbo fornite con il kit.
5. Coprire con il coperchio ed incubare a 37°C per 18 - 24 ore
6. Riportare i risultati dei pozzetti delle file A-B-C (oppure E-F-G), che non richiedono aggiunta di reattivo: ARA, MEGLU, X-GLUPY
7. Aggiungere una goccia di reattivo dimetilaminobenzaldeide ai pozzetti della fila D (o H) e riportare i risultati del test AMP
8. Leggere i risultati e procedere all'identificazione in accordo alle indicazioni delle tabelle che seguono
9. Nel caso il supporto plastico delle strisce ed il coperchio debbano essere riutilizzati, lavarli con soluzione disinfettante

### LETTURA DEI RISULTATI

TEST	COLORE REAZIONE POSITIVA	COLORE REAZIONE NEGATIVA
Arabitol (ARA)	paglierino	blu o verde blu
Metil-glucoside (MEGLU)	paglierino	blu o verde blu
Beta-glucosidase (X-GLUPY)	blu – azzurro	incolore
aminopeptidasi (AMP)	giallo (dopo aggiunta di dimetilaminobenzaldeide)	incolore (dopo aggiunta di dimetilaminobenzaldeide)

**INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI**

ARA	MEGLU	X-GLUPY	AMP	IDENTIFICAZIONE
-	-	-	*	Non- <i>Listeria</i> sp.
-	+	+	*	Non- <i>Listeria</i> sp.
-	-	+	*	Non- <i>Listeria</i> sp.
-	+	-	*	Non- <i>Listeria</i> sp.
+	-	-	*	Non- <i>Listeria</i> sp.
+	-	+	*	Non- <i>Listeria</i> sp.
+	+	-	*	Non- <i>Listeria</i> sp.
+	+	+	+	<b><i>Listeria non monocytogenes</i></b>
+	+	+	-	<b><i>Listeria monocytogenes</i></b>

\* Quando anche uno solo dei test ARA, MEGLU, X-GLUPY è negativo, la lettura del test AMP è ininfluente, poiché è esclusa la presenza di *Listeria*.

**CONTROLLO QUALITA'**

Se si desidera effettuare un controllo di qualità del kit, utilizzare come ceppo positivo *L.monocytogenes* ATCC 13932 oppure ATCC 19111 e come ceppo negativo *L.innocua* ATCC 33090.

**LIMITI DEL METODO**

Il test deve essere effettuato solo su colonie prelevate da un terreno selettivo solido per *Listeria* (es. ALOA, PALCAM, Oxford). Per l'esecuzione del test non sono idonei i terreni non selettivi ed il terreno Mc Bride Selective Agar.

**PERFORMANCE**

Le performance del kit sono state valutate su 156 ceppi di *L.monocytogenes* strains e su 77 ceppi di *Listeria* "non *monocytogenes*". Tutti i ceppi di *Listeria* "non *monocytogenes*" sono stati correttamente identificati a livello di genere; tutti i ceppi di *L.monocytogenes* sono stati identificati a livello di genere e differenziati dai ceppi di *Listeria* "non *monocytogenes*".

**AVVERTENZE**

- 1) Il reattivo dimetilaminobenzaldeide si presenta di colore giallo chiaro limpido
- 2) I substrati essiccati nei pozzetti si presentano con i seguenti colori: pozzetti A-E verde-blu, pozzetti B-F blu, pozzetti C-G incolori, pozzetti D-H incolori.
- 3) Nel caso di marcati cambiamenti di colore del reattivo o dei pozzetti eliminare il prodotto e consultare il nostro servizio assistenza tecnica

**PRECAUZIONI E SICUREZZA DEGLI OPERATORI**

- 1) Il kit contiene il reattivo dimetilaminobenzaldeide classificato come Xn (nocivo) ai sensi della legislazione vigente; consultare la scheda di sicurezza prima dell'uso.
- 2) L'insieme dei 4 pozzetti contenuti nella piastra non sono riutilizzabili né frazionabili.
- 3) Il kit qui descritto è solo per uso diagnostico *in vitro* ed è destinato ad un ambito professionale. Deve essere usato in laboratorio da operatori adeguatamente addestrati, con metodi approvati di asepsi e di sicurezza nei confronti degli agenti patogeni.
- 4) Sterilizzare i materiali inoculati con materiali patologici dopo l'uso e prima dell'eliminazione come rifiuto.

**CONSERVAZIONE**

Conservare il kit a 2°-8°C ed impiegarlo entro la data di scadenza riportata in etichetta. Conservare la piastra nella confezione originale, tenuta chiusa, a 2-8°C. Eliminare se vi sono segni evidenti di deterioramento.

**BIBLIOGRAFIA**

- Avoyne, C., Butin, M., Delaval, J., Bind, L. (1995) Etude de la spécificité d'une méthode rapide pour l'identification de *Listeria monocytogenes* : le Mono Confirm Test., Lait, 76, 405-411,1996
- Cantoni, C., Ottaviani, F., Carozzi, F., (1994) Evaluation of a new miniaturized system for *Listeria monocytogenes* identification: Mono Confirm Test. Ind. Alim. XXXIII, 1103.
- Lachica R.V. (1990) Same day identification scheme for colonies of *Listeria monocytogenes*. App. Environ. Microbiol., 56, 1166.
- Ottaviani, F., (1994) Mono-Confirm: a miniaturized system for *Listeria monocytogenes* confirmation. 3ème Conférence Internationale ASEPT, Laval, 1-2 Juin 1994.
- Rocourt, J., Catimel, B (1985) Caractérisation biochimique des especes du genre *Listeria*. Zbl. Bakt. Hyg., A260, 221

**CONFEZIONE**

**193000 Mono Confirm Test, 24 tests**

Materiale ausiliario  
524510 Inoculation Fluid 24 provette